

Л.Н.Миронова, С.Г.Инге-Вечтомов,
Л.В.Лызлова, Е.С.Фоминых,
А.П.Сургучев, В.Н.Смирнов

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТРАНСЛЯЦИИ ТЕРМИНИРУЮЩИХ КОДОНОВ
У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Кафедра генетики и селекции ЛГУ,
Всесоюзный кардиологический центр АМН СССР, Москва

Изучение супрессии нонсенс- и миссенс-мутаций - наиболее адекватный подход к выяснению генетического контроля трансляции у организмов любой степени сложности. Это обусловлено тем, что клетка способна нейтрализовать последствия мутаций, прерывающих считывание генетического кода (нонсенс-мутации) или искажающих его смысл (миссенс-мутации), благодаря специфическим изменениям различных компонентов аппарата трансляции. Таким образом, исследование супрессии позволяет проводить селекцию мутантов по генам, контролирующим молекулы, прямо или косвенно участвующие в трансляции.

Лучше всего изучена в настоящее время трансляционная супрессия, связанная с возникновением мутаций в структурных генах для тРНК, точнее в определенных участках этих генов, контролирующих нуклеотидную последовательность антикодона. Замена основания в антикодоне тРНК может привести к изменению адапторных свойств молекулы, а это, в свою очередь, - к способности молекул, принадлежащих к данной фракции, "осмысливать" нонсенс-кодона или "переосмысливать" миссенс-кодона. Существование такого механизма супрессии по крайней мере для нонсенс-мутаций неопределимо доказано в серии работ Смита с сотр. (Smith, 1972).

Вместе с тем в последние годы получены экспериментальные данные, говорящие о том, что трансляция нонсенс-кодонов может происходить и в отсутствие таких супрессорных мутаций, следствием которых является возникновение новых декодирующих свойств у молекул тРНК. Об этом говорит обнаружение остаточных активностей ферментов орнитинтранскарбамилазы и щелочной фосфатазы в клетках *Escherichia coli*, несущих нонсенс-мутации в соответствующих структурных генах (Gorini, 1969; Rozen e.a., 1969) и не несущих супрессоры, подавляющие проявление этих мутаций. Отсутствие эффекта супрессии, обнаруживаемого на фенотипическом уровне, наводит на мысль, что аппарату трансляции присуща способность к низкоэффективному считыванию нонсенс-кодонов как значащих кодонов.

Возможность и эффективность считывания нонсенсов зависят от функционирования многих компонентов аппарата трансляции. Так, в частности, установлено, что определенные рибосомальные белки контролируют точность трансляции (Gorini, 1969, 1971). При этом мутационное изменение одних белков стимулирует считывание нонсенсов, других - ограничивает.

Способствуют считыванию нонсенс-кодонов и мутации, нарушающие термостабильность. Филлипс с сотр. обнаружил *ts*-мутант *E.coli*, не синтезирующий белок при 43° (Phillips e.a., 1969a, 1969b). При этой температуре в клет-

ках мутанта синтезированные белки не освобождались от связи с рибосомой. При температуре 36° *in vivo* и *in vitro* мутация температурочувствительности вела себя как супрессор по отношению к охр- и опад-мутациям; при 30° супрессорный эффект отсутствовал. Несмотря на то, что специфичность супрессии совпадала со специфичностью белка-терминатора RF2, добавление активного RF2 в бесклеточную систему не стимулировало терминацию. Оказалось, что терминацию стимулирует другой белок, выделенный из супернатанта. Он обозначен как фактор Z. Из того, что функция этого белка состоит в освобождении полипептидной цепи от рибосомы, а отнюдь не в осмысливании нонсенс-кодонов, следует, что супрессорная активность, обнаруженная у мутанта по фактору Z, — лишь косвенное следствие этой мутации.

Таким образом, трансляция в бактериальной клетке характеризуется неоднозначностью, которая может усиливаться в результате некоторых мутаций.

Рецессивная суперсупрессия у дрожжей

Модель для исследования генетического контроля трансляции нонсенс-кодонов у эукариотов создана на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* Петергофских генетических линий.

При исследовании суперсупрессии у этих штаммов наряду с супрессорами, проявляющими разную степень доминантности по отношению к нонсенс-мутациям, были получены рецессивные супрессоры. В первых экспериментах было выделено 6 рецессивных супрессорных мутаций среди 42 спонтанных ревертантов штамма 6-ПЗ, ауксотрофного по аденину вследствие мутации в гене *ade₁* (Инге-Вечтомов, 1964). Рецессивность этих супрессоров проявлялась в том, что диплоиды, гетерозиготные по ним и гомозиготные по супрессируемым мутациям, были ауксотрофами.

Рецессивные супрессоры распределились по двум генам, *sup₁* и *sup₂*. Аллельная специфичность одной из супрессорных мутаций, *sup₂₋₄₈*, была подробно исследована (Инге-Вечтомов, Симаров, 1967) при тетрадном анализе гибридов, гетерозиготных по различным мутациям гена *ade₂* и по *sup₂₋₄₈*. Полученные данные указывали на то, что данный супрессор представляет собой нонсенс-супрессор. Все аллели *ade₂*, супрессируемые им, проявляют полярный характер комплементации или вовсе неспособны к ней. Такое поведение в тестах на межаллельную комплементацию свойственно, как известно, аллелям, несущим нонсенс-мутации (Manney, 1964). Кроме того, все мутации, супрессируемые *sup₂₋₄₈*, супрессировались доминантными нонсенс-супрессорами того или иного из двух известных тогда типов.

Исследование влияния *sup₂₋₄₈* на межаллельную комплементацию в гене *ade₂* подтвердило, что рецессивные супрессоры действуют на трансляцию только тех аллелей, которые несут нонсенс-мутации. При этом *sup₂₋₄₈* оказался способным транслировать по меньшей мере нонсенс-кодоны двух типов (Инге-Вечтомов, Симаров, 1967). Индукция комплементации супрессором наблюдалась лишь при гомозиготности по супрессору, независимо от сочетания нонсенс-аллелей *ade₂*, что подтвердило его рецессивность. Рецессивность мутаций *sup₁* и *sup₂* была показана в дальнейшем и при действии их на мутации *his_x*, *lys_{0-A2}*, *leu₂₋₂* (Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970; Мирнова, 1973).

Рецессивные супрессоры обладают самостоятельным фенотипическим выражением, которое проявляется в виде снижения скорости роста гаплоидных штаммов, несущих рецессивные супрессоры, по сравнению со штаммами дикого типа или штаммами, несущими доминантные супрессоры (Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970). Исследование жизнеспособности клеток в потомстве митотически размножающихся диплоидных штаммов, гомо- и гетероаллельных по рецессивным супрессорам, показало, что она, как правило, довольно низка.

Для расширения фенотипической характеристики рецессивных супрессоров была исследована способность большого числа мутантов по генам sup_1 и sup_2 расти при температуре 36° . Оказалось, что некоторые штаммы, содержащие в своем генотипе рецессивные супрессоры, чувствительны к действию этой температуры и не растут или плохо растут при инкубировании в 36° (Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970).

До настоящего времени не получено данных о существовании иных генов, кроме sup_1 и sup_2 , мутации в которых приводят к рецессивному супрессорному эффекту, поскольку более 300 исследованных рецессивных супрессоров распределились только по этим генам. Ген sup_1 локализован во II хромосоме (Тер-Аванесян, Инге-Вечтомов, 1974). Ген sup_2 , не сцепленный с sup_1 , пока не локализован. Гены sup_1 и sup_2 , по всей видимости, аналогичны генам sup_{45} и sup_{35} , которые локализованы во II и IV хромосомах соответственно (Hawthorne, 1969; Hawthorne, Leupold, 1974). Данный вывод основан на сопоставлении свойств мутаций по этим генам: рецессивности супрессорного эффекта, влияния на скорость роста, специфичности.

Тетрадный анализ гибридов, дигетерозиготных по sup_1 и sup_2 , показал, что соотношение жизнеспособных и нежизнеспособных спор в потомстве этих гибридов близко к соотношению 3:1 и что сочетание обеих мутаций в гаплоидном геноме летально (Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970). Подобный эффект не отмечен для супрессоров sup_{45} и sup_{35} (Hawthorne, Leupold, 1974), что может служить указанием на аллелеспецифичность его проявления.

Функциональный тест на аллелизм рецессивных супрессоров может быть проведен не только по эффекту супрессии, но и по температурочувствительности. Это было показано при скрещивании ts -мутантов, несущих рецессивные супрессоры. Если скрещиваемые мутанты несли неаллельные супрессоры, то гибрид рос на среде YAPD при температуре 36° (эффект супрессии при этом отсутствовал). Если супрессорные мутации были аллельны, то гибрид при 36° не рос. Таким образом, факторы температурочувствительности ведут себя как аллели генов sup_1 и sup_2 (Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970).

Перечисленные свойства мутантов по генам sup_1 и sup_2 , выявленные в ходе генетического анализа, позволяют сделать некоторые предварительные выводы относительно функции этих генов.

Несмотря на трансляцию нонсенс-кодонов в присутствии исследуемых супрессоров, рецессивность эффекта супрессии указывает на то, что мутации по генам sup_1 и sup_2 не приводят к появлению в клетке молекул, считываемых как нонсенсы. Иными свойствами обладают мутации в структурных генах для тРНК. Замены оснований в этих генах могут приводить к появлению у молекул, синтезируемых под их контролем, антикодонов, комплементарных кодон-нонсенсам. Известно, что в геноме любой и, в частности, дрожжевой клетки имеется по несколько копий генов для каждой фракции тРНК (Mortimer, 1969). Несмотря на это способность тРНК одной из этих фракций транслировать нонсенсы всегда будет проявляться как доминантный признак, так

как наличие любой функции в клетке доминантно по отношению к ее отсутствию. Из этого следует, что рецессивные супрессорные мутации не могут быть мутациями в структурных генах для тРНК.

По аналогии с данными Филлипса и др. (Phillips e.a., 1969a, 1969b) можно предположить, что под контролем генов sur_1 и sur_2 синтезируются белки, участвующие в терминации. С этим предположением согласуется факт обнаружения ts -мутантов среди мутантов по генам sur_1 и sur_2 . Как уже отмечалось, эти мутанты не способны расти при температуре 36° . Таким свойством, как правило, обладают мутанты по генам, контролирующим белки, поскольку в гаплоидной клетке весь белок, синтезируемый под контролем мутантного гена, термолабилен.

К появлению температурочувствительных молекул могут приводить и мутации в структурных генах для тРНК. Однако в связи с тем, что в геноме имеется несколько одинаковых генов для каждой фракции тРНК, мутирование одного из генов, контролирующих данную фракцию, не приводит к летальному исходу при попадании клетки в непермиссивные условия. Если в результате мутации под контролем данного гена синтезируются термолабильные молекулы тРНК, обладающие супрессорной активностью, то при повышенной температуре имеет место исчезновение супрессорного эффекта, а не гибель клетки. Такие мутанты по тРНК получены у *E.coli* (Yamamoto e.a., 1972). Если же допустить, что супрессорная мутация затрагивает структурный ген для тРНК, представленный в геноме в единственном числе, то изменение адапторных свойств у молекул, принадлежащих к данной фракции, будет летально при любых условиях, так как оно обусловит полное отсутствие нормальной функции у данной разновидности тРНК. Мутации такого типа обладают доминантной супрессорной активностью и являются рецессивными летальными. Подобные мутанты также обнаружены у *E.coli* (Soll, Berg, 1969).

Влияние рецессивных супрессоров на трансляцию

Как мы отмечали, некоторые мутанты по генам sur_1 и sur_2 проявляют чувствительность к температуре 36° . Это свойство предоставляет дополнительные возможности для изучения влияния супрессоров на процесс белкового синтеза путем идентификации его температурочувствительной стадии.

У исследованного с этой целью ts -мутанта по гену sur_2 , в отличие от исходного штамма, через 60 мин инкубации клеток при 36° белковый синтез оказался почти полностью подавлен (Smirnov e.a., 1974). Резкое падение включения меченых ^{14}C -аминокислот в белки наблюдается уже через 5 мин инкубации клеток при 36° ; при этом оно не сопровождается гибелью клеток (по крайней мере в течение двух часов).

Изучение полирибосом у того же мутанта показало, что при 36° происходит уменьшение количества тяжелых (активных в белковом синтезе полисом) и увеличение количества неактивных одиночных 80S рибосом. Такая перестройка белоксинтезирующего аппарата начинается через 5-10 мин после начала инкубации клеток мутанта при 36° , а уже через 30 мин одиночные 80S рибосомы составляют более 90% всех рибосом клетки. В течение этого же времени и в тех же условиях в клетках исходного штамма, не несущего супрессорную мутацию, таких изменений не происходит. Изменение профиля седиментации рибосом в градиенте концентрации сахарозы после инкубации

ts -мутанта при 36° представлено на рис.1. Наблюдаемый распад полисом является, по-видимому, непосредственной причиной подавления белкового синтеза у мутанта при повышении температуры. Действительно, оба эти процесса удается зарегистрировать примерно в одно и то же время (через 5-10 мин) после помещения клеток в температуру 36° .

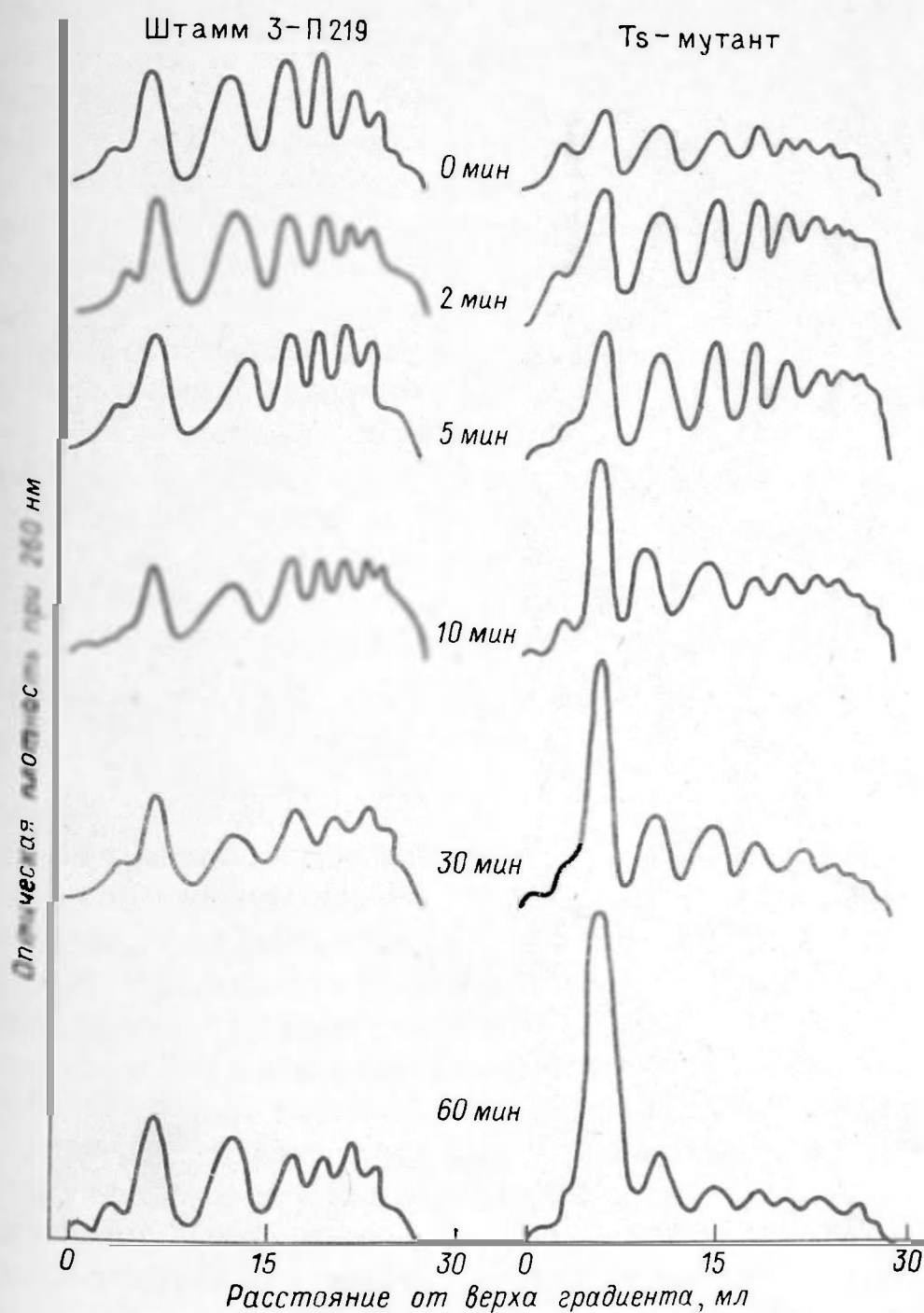


Рис.1. Изменение профиля полисом у ts -мутанта 14-3-П219 после переноса клеток в 36° (см. текст).

Что представляют собой 80S рибосомы, накапливающиеся при повышенной температуре у мутанта по гену sur_2 ? Судя по их способности диссоциировать на 40S и 60S субчастицы при повышенной концентрации KCl, это - рибосомы, закончившие трансляцию и осуществившие нормальный процесс терминации, т.е. свободные от пептидил-тРНК. Как известно, рибосомы, несущие пептидил-тРНК, в этих условиях на субчастицы не диссоциируют. Кривые оптической плотности при 260 мкм, полученные при анализе 80S рибосом из клеток

ts-мутанта и исходного штамма после инкубации их в 36° , в градиентах сахарозы, содержащих разную концентрацию KCl, представлены на рис.2.

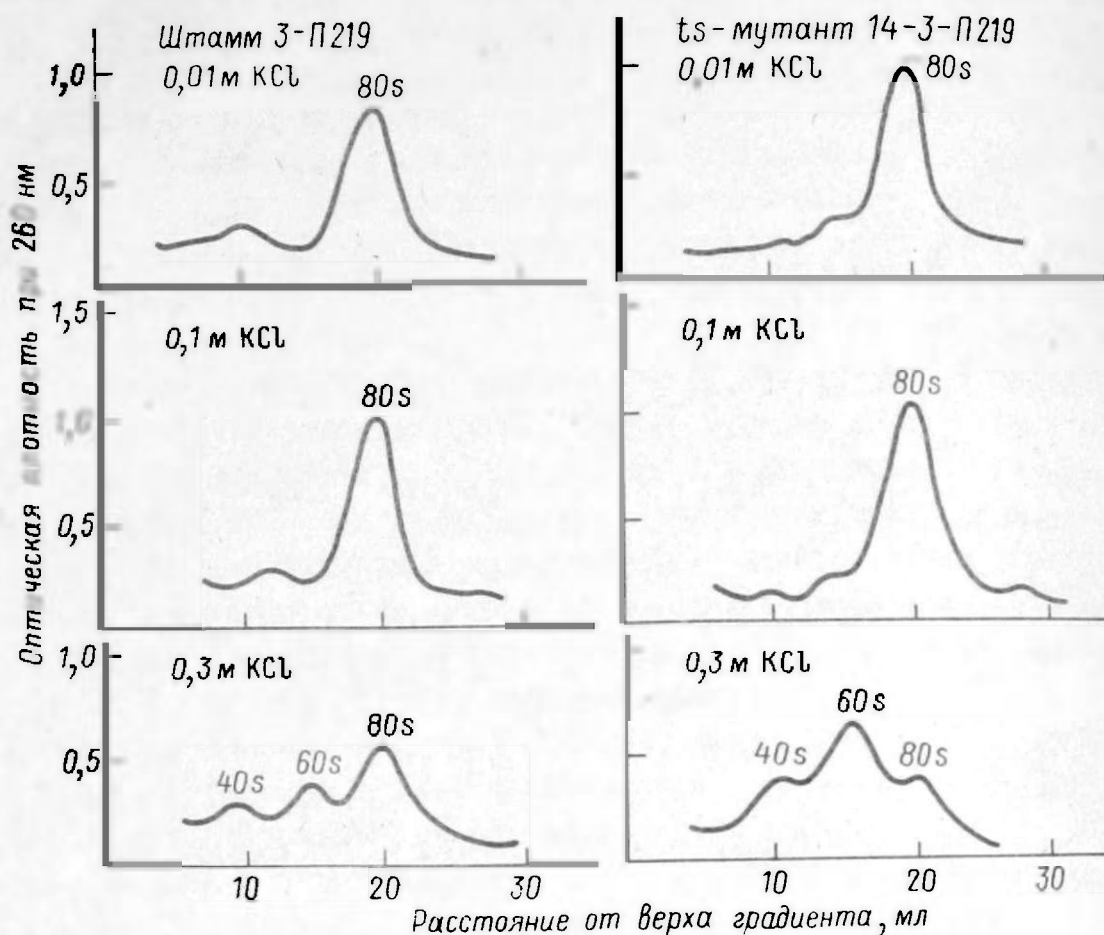


Рис.2. Диссоциация 80S рибосом из экстрактов "прогретых" клеток исходного штамма 3-П219 и *ts*-мутанта 14-3-П219 в градиенте с высокой концентрацией соли (см. текст).

Кроме того, рибосомы 80S, накапливающиеся у *ts*-мутанта при 36° , нормально диссоциируют на субчастицы под действием частично очищенного фактора диссоциации из клеток исходного штамма. Чувствительность мутантного штамма к повышенной температуре не связана с нарушениями в работе фактора диссоциации, так как после прогревания фактора диссоциации, выделенного из клеток *ts*-мутанта, при 40° в течение 20 мин он эффективно вызывает диссоциацию 80S рибосом.

Нам не удалось обнаружить и температурочувствительность факторов терминации. В экспериментах с бесклеточной белоксинтезирующей системой, полученной из клеток мутанта по гену *sup*₂, освобождение полипептидов, синтезированных на эндогенных матрицах, зависело от количества добавленных растворимых факторов.

Таким образом, подавление белкового синтеза при повышенной температуре у супрессорного мутанта нельзя приписать нарушению терминации или диссоциации рибосом. Скорее можно предполагать, что в результате супрессорной мутации происходит нарушение инициации белкового синтеза, вследствие чего в клетке при повышенной температуре и накапливаются 80S рибосомы.

Итак, эффект *ts*-мутаций в гене *sup*₂ (а возможно, и *sup*₁) заключается в изменении рибосом, приводящем:

- при пермиссивных условиях к считыванию нонсенс-кодонов;
- при пермиссивных условиях - к подавлению образования полипептидов, причиной которого, возможно, являются нарушения процесса инициации.

В последнее время появляются сведения, говорящие о множественной функции ряда компонентов рибосомы. Так, например, белки L7 и L12, помимо участия в связывании фактора терминации с рибосомой, влияют на зависимость от факторов инициации связывание фмет-тРНК (Grunberg-Manago e.a., 1973; Grunberg-Manago e.a., 1974). гидролиз ГТФ, связывание фактора EF-G и транслокация (Tate, Caskey, 1974). Кроме того, такая сложная структура, какой является рибосома, обладает и значительной степенью аллостерических взаимодействий, при которых мутационное изменение какого-либо одного белка может повлиять, за счет так называемой рибосомной плеiotропии (Apirion, Schllessinger, 1969), на функцию других белков рибосомы.

Не исключено, что и в нашем случае один и тот же белок рибосомы принимает участие в опознавании нонсенс-кодонов и в осуществлении инициации. То, что нам не удалось выявить нарушения терминации при изучении белкового синтеза у мутанта по гену sup_2 , отнюдь не говорит о нормальном протекании терминации в его клетках. О нарушениях в считывании сигналов терминации говорит сам эффект нонсенс-супрессии. В то же время частота неоднозначной трансляции нонсенс-кодонов, по-видимому, очень низка.

Дополнительным указанием на нарушение считывания терминирующих кодонов у мутантов по генам sup_1 и sup_2 являются данные о взаимодействии рецессивных и доминантных супрессоров у дрожжей. Объединение супрессор-мутаций этих двух типов в гаплоидных клетках приводит к резкому ингибированию скорости роста (Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970).

Судя по свойствам всех изученных к настоящему времени доминантных супрессоров у дрожжей, они, также как и доминантные супрессоры у бактерий, приводят к изменению адапторных свойств тРНК (Hawthorne, Leupold, 1974). Если это так, эффект взаимодействия рецессивных и доминантных супрессоров у дрожжей может быть связан с тем, что тРНК, способная считывать нонсенсы, усиливает нарушения терминации, обусловленные рецессивной супрессорной мутацией. Конкурентные взаимоотношения супрессорных тРНК и белковых факторов терминации продемонстрированы в бактериальной бесклеточной системе (Ganoza, Tompkins, 1970; Beaudet, Caskey, 1972). Поскольку конкуренция нонсенс-супрессорных тРНК и белковых факторов терминации направлена на взаимодействие с рибосомой, то мутации, изменяющие некоторые центры рибосомы, могут влиять на результат этой конкуренции. У бактерий мутациями такого типа являются мутации в гене gam (Gorini, 1971). Подобным эффектом, возможно, обладают и рецессивные супрессорные мутации у дрожжей.

Генетический контроль трансляции нонсенс-кодонов

При исследовании рецессивной супрессии было обнаружено расщепление по дополнительным факторам, контролирующим возможность и эффективность проявления супрессии, в потомстве гибридов, гетерозиготных по мутации sup_{2-48} (Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970). Детальный анализ такого расщепления был проведен в потомстве гибрида П854, гетерозиготного по нонсенс-мутации ade_{2-131} III типа (Simarov e.a., 1971; Симаров и Мирнова, 1972) и полудоминантной супрессорной мутации в гене sup_2 , Sup_{2-14}^{ts} . Полудоминантность этой мутации является косвенным свидетельством того, что продукт гена sup_2 - некий белок, состоящий из идентичных субъединиц, по-

сколькx полудоминантный супрессорный эффект мутации, затрагивающей белок, может быть лишь следствием негативной комплементации нормальной и мутантной аллелей гена sup_2 (Андрианова и др., 1973).

В случайной выборке аскоспор гибрида П854 при учете опыта на 7-е сутки было обнаружено моногенное расщепление по потребности в аденине, свидетельствующее о несупрессируемости ade_{2-131} в присутствии $\text{Sup}_{2-14}^{\text{ts}}$.

Однако более длительная (20-дневная) инкубация ауксотрофных по аденину и одновременно температурочувствительных сегрегантов на среде, не содержащей аденина, показала, что из 144 проверенных штаммов 56 способны к медленному росту на этой среде. Следовательно, в потомстве гибрида происходит расщепление по какому-то фактору (или факторам), влияющему на супрессию.

О существовании таких факторов говорят и результаты исследования проявления Sup_{2-14} в диплоидной клетке. Скрещивание сегрегантов генотипа $\text{ade}_{2-131}\text{Sup}_{2-14}$, ауксотрофных по аденину, т.е. не содержащих комбинацию факторов, необходимую для супрессии ade_{2-131} , привело в ряде случаев к образованию прототрофных по аденину гибридов (21 случай в 253 комбинациях сегрегантов). Матрица этих скрещиваний представлена в табл. I.

Т а б л и ц а I

Матрица скрещиваний сегрегантов
гибрида П854, имеющих генотип $\text{ade}_{2-131}\text{Sup}_{2-14}^{\text{ts}}$

	20	21	22	28	29	30	31	32	38	39
56	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
59	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
67	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
69	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
73	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
74	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

П р и м е ч а н и е. «+» - образование прототрофного гибрида, «-» - отсутствие прототрофного гибрида.

Прототрофность гомоаллельного гибрида не может быть следствием межаллельной комплементации, так как полипептиды - продукты мутантных гомоаллелей - не могут образовать активный мультимер. Если допустить, что Sup_{2-14} вызывает трансляцию мутантной аллели у разных сегрегантов за счет различных аминокислот, всегда несовместимых с функцией фременты, то прототрофность должна быть следствием взаимоисправления "плохих" субъединиц. Согласно теории межаллельной комплементации, карта, отражающая взаимоотношения таких аллелей, должна быть циклической (Crick, Orgel, 1964).

Построив карту по матрице скрещиваний (табл. I) в соответствии с традиционными правилами построения карт комплементации («+» - неперекрывание функциональных повреждений; «-» - перекрывание), мы получили практически линейную карту (рис. 3). Таким образом, предположение о взаимоисправ-

"плохих" субъединиц фермента, кодируемого геном ade_2 , не соответствует действительности и прототрофность гибридов не есть результат взаимодействия аллелей ade_2 ; построенная же нами карта отражает, по-видимому, взаимодействие не аллелей, а отдельных генов. Причиной прототрофности гибридов, гомоаллельных по ade_2 , является, следовательно, супрессия, происходящая при специфическом подборе генотипических факторов в диплоидной клетке. В связи с тем, что результатом действия этих факторов является нонсенс-супрессия, данный эффект может, очевидно, служить критерием для отбора мутантов по генам, контролирующим трансляцию нонсенс-кодонов.

Индукция и анализ таких мутантов были связаны с получением реверсий к прототрофности по гистидину и лейцину у штамма 13A-1922

($\alpha ade_{2-223} his_x lys_9-A21 leu_{2-2} met_{A1}$). Работа состояла из двух этапов. На первом этапе были выделены ревертанты к прототрофности по гистидину за счет рецессивных супрессоров, причем для дальнейшей работы использовали температуроустойчивые мутанты по генам sup_1 и sup_2 . Поскольку мутации his_x и leu_{2-2} являются нонсенс-мутациями одного и того же (I) типа, получение ревертантов, несущих рецессивные супрессоры, подавляющие проявление только мутации his_x , говорит о том, что для считывания нонсенс-кодона в гене leu_2 у отобранных нами мутантов нужны дополнительные генотипические изменения.

Для проверки этого предположения у 5 ревертантов к прототрофности по гистидину индуцировали реверсии к прототрофности по лейцину. Среди

полученных "вторичных" ревертантов мы обнаружили 17 штаммов, чувствительных к 36^0 , которые и были использованы для последующего генетического анализа.

Температурочувствительность этих штаммов позволила провести функциональный тест на аллелизм вновь возникших мутаций мутациям в генах sup_1 и sup_2 также обуславливающим ts -фенотип. Все гибриды, полученные в этих скрещиваниях, оказались устойчивыми к температуре 36^0 , т.е. температурочувствительность, обуславливаемая исследуемыми мутациями, рецессивна по отношению к температуроустойчивости, а сами мутации не аллельны мутациям sup_1 и sup_2 . Этот вывод получил подтверждение в результате тетрадного анализа двух гибридов, полученных при скрещивании "вторичных" ревертантов со штаммом 11B-П2111, генотипа $ahis_x lys_2-A12 leu_{2-2}$. Важно подчеркнуть, что анализируемые гибриды гомозиготны по мутациям his_x и leu_{2-2} и гетерозиготны по рецессивному супрессору (в обоих случаях это мутация в гене sup_1) и по мутациям, вызвавшим вторичную реверсию.

31						
32						
20	30	38	39	59		
73						
74	76					
69						
	29					
		67	70	71	72	
			66			
				28		
					22	56
						21

Рис.3. Карта, построенная по матрице скрещиваний, представленной в табл. I.

В связи с тем, что анализируемые гибриды гомозиготны по мутации his_x , мы могли следить за расщеплением по гену sup_1 , так как он как бы маркирован прототрофностью по гистидину. Расщепление по вновь возникшей мутации учитывали как расщепление по чувствительности к 36^0 . Характер расщепления по потребности в лейцине должен зависеть от механизма второй реверсии. Если вновь возникшая мутация сама по себе обуславливает супрессию leu_{2-2} , то половина сегрегантов в потомстве анализируемых гибридов должна быть прототрофна по лейцину. Если же эта мутация лишь способствует супрессии при нарушениях терминации, обусловленных мутацией sup_1 , то прототрофные по лейцину сегреганты могут появиться лишь при сочетании ее с рецессивным супрессором. Такие сегреганты должны составлять 1/4 часть потомства. Фактическое расщепление по потребности в лейцине совпало с теоретически ожидаемым при взаимодействии sup_1 и вновь возникшей мутации (табл.2). Расщепление по потребности в гистидине (т.е. по мутации в гене sup_1) и по температурочувствительности соответствует теоретически ожидаемому моногенному расщеплению (табл.3).

Т а б л и ц а 2

Расщепление по потребности в лейцине в случайной выборке аскоспор гибридов П951 и П952

$$\frac{a \text{ his}_x \text{ leu}_{2-2} \text{ sup}_1}{\alpha \text{ his}_- \text{ leu}_{2-2} \text{ sup}_1} \frac{x}{+}$$

Соотношение сегрегантов	Гибрид	
	П951	П952
Наблюдаемое	32 : 10	40 : 19
Теоретически ожидаемое при взаимодействии sup_1 и x	31,5 : 10,5 $\chi^2 = 0,03$; $P > 0,05$	44,4 : 14,8 $\chi^2 = 1,82$; $P > 0,05$
Теоретически ожидаемое в отсутствие взаимодействия sup_1 и x	21 : 21 $\chi^2 = 11,4$; $P < 0,05$	29,5 : 29,5 $\chi^2 = 7,6$; $P < 0,05$

П р и м е ч а н и е. Символом "х" обозначена мутация, обуславливающая реверсию к прототрофности по лейцину и чувствительность к 36^0 .

Т а б л и ц а 3

Расщепление по потребности в гистидине и по температурочувствительности в случайной выборке аскоспор гибридов П951 и П952

Соотношение сегрегантов	Гибрид			
	П951		П952	
	His ⁻ :His ⁺	Ts:Tr	His ⁻ :His ⁺	Ts:Tr
Наблюдаемое	20 : 22	21 : 21	26 : 33	29 : 30
Теоретически ожидаемое	21 : 21 $\chi^2 = 0,08$ $P > 0,50$	21 : 21 $\chi^2 = 0$ $P > 0,99$	29,5 : 29,5 $\chi^2 = 0,82$ $P > 0,02$	29,5 : 29,5 $\chi^2 = 0,20$ $P > 0,95$

Наличие взаимодействия между рецессивной супрессорной мутацией и вновь возникшей мутацией подтверждают и результаты анализа прототрофных по лейцину сегрегантов. Теоретически возможные фенотипические классы прототрофных по лейцину сегрегантов и количество сегрегантов каждого класса в расщеплении обоих гибридов представлено в табл.4. Как следует из этих данных, все прототрофы по лейцину прототрофны и по гистидину (т.е. несут мутацию sur_1) и температурочувствительны. Вместе с тем иногда супрессия происходит и в отсутствие мутации, обуславливающей ts -фенотип. Об этом говорит обнаружение прототрофного по лейцину и гистидину и температуроустойчивого сегреганта в расщеплении гибрида П952 (см.табл.4). Этот факт подтверждает сходство механизма действия полученных нами мутаций и естественных факторов, которые составляют генотипический фон, способствующий нонсенс-супрессии.

Т а б л и ц а 4

Фенотип прототрофных по лейцину сегрегантов
из расщепления гибридов П951 и П952

Возможные фенотипические классы	Число сегрегантов, обладающих данным фенотипом, в случайной выборке	
	П951	П952
Leu^+His^+Ts	10	18
Leu^+His^+Tr	0	1
Leu^+His^-Ts	0	0
Leu^+His^-Tr	0	0

Результаты исследования вторичных ревертантов, полученных у штаммов, мутантных по генам sur_1 и sur_2 , позволяют сделать вывод о том, что механизм вторичных реверсий состоит в создании условий для считывания кодов-нонсенсов. Гены, в которых возникают эти мутации, были обозначены символом Ntf (Nonsense translation factors). По-видимому, они идентичны или сходны по своим функциям с теми генами, которые выявлены при изучении взаимодействия мутаций ade_{2-131} и Sur_{2-14} .

Пять независимо полученных мутаций в генах Ntf, обуславливающих ts -фенотип, на основании функционального теста на аллелиах распределены по трем группам, которые могут соответствовать трем различным генам (табл.5). При этом распределение мутаций по группам связано с проявлением эффекта супрессии в гетерозиготе. Мы показали, что гибриды, гомозиготные по мутации leu_{2-2} и гетерозиготные по sur_1 и Ntf, в разной степени способны к росту на среде без лейцина. Если рост гибрида на среде без лейцина был замечен на 2-3-и сутки, то Ntf - мутацию считали доминантной; если гибрид подрастал на 7-10-е сутки, - полудоминантной; если гибрид не вырастал на среде без лейцина в течение 14 суток, - рецессивной. Температурочувствительность мутантов по генам Ntf, а также рецессивность ts -фенотипа, вызванного мутациями в этих генах, указывает на то, что гены Ntf контролируют некие белки. Полученные результаты не позволяют сделать вывод о функции этих белков, однако на их основании можно выдвинуть некоторые предположения.

Т а б л и ц а 5
Функциональный тест на аллелизм между Ntf-мутантами

Мутанты	2-13 (5)	10-13 (5)	1-10 (4)	2-10 (2)	22-13 (5)
2-13 (2)	-	-	+	+	+
10-13 (9)	-	-	+	+	+
1-10 (5)	+	+	-	-	+
2-10 (4)	+	+	-	-	+
22-13 (4)	+	+	-	-	-
Гены	Ntf1		ntf2		Ntf3

П р и м е ч а н и е. В скобках у номера мутанта
указано количество штаммов, несущих данную мутацию Ntf.

Известно, в частности, что молекулы тРНК претерпевают длительное созревание, связанное с устранением из молекулы-предшественника большого количества концевых нуклеотидов и модификацией некоторых нуклеотидов, остающихся в составе функционально активной молекулы. Нарушения в работе ферментов, модифицирующих тРНК, могут приводить к изменению свойств некоторых нуклеотидов, а это, в свою очередь, — к изменению адапторных свойств молекулы. В качестве примера можно привести изменение адапторных свойств у тРНК^{Фен} *E.coli*, обусловленное устранением минорного нуклеотида, соседнего с 3'-нуклеотидом антикодона (Ghosh, Ghosh, 1972).

Изменение адапторных свойств может вызывать у молекул тРНК определенной фракции способность осмысливать нонсенс-кодоны, проявляющуюся особенно четко при блокировании терминации. Хотя теоретически такой механизм супрессии вполне возможен, супрессоры, действующие подобным образом, в настоящее время не обнаружены.

Более вероятно, на наш взгляд, что гены Ntf контролируют рибосомальные белки. Как мы упоминали, мутации, изменяющие белки рибосомы, могут как препятствовать супрессии, так и способствовать ей (Gorini, 1969, 1971). Если в клетке есть тРНК со слабой супрессорной активностью, "мутантная" рибосома может стимулировать их связывание с нонсенс-кодоном. Если таких тРНК в клетке нет, рибосома может играть роль посредника во взаимодействии нонсенса с тРНК, имеющей некомплементарный нонсенсу антикодон.

Важно подчеркнуть, что, какова бы ни была природа макромолекул, контролируемых генами Ntf, сам факт существования таких генов говорит о лабильности аппарата трансляции. Изучение рецессивной супрессии показывает, таким образом, что аппарату белкового синтеза присуща поливариантность, выражающаяся в различном характере трансляции терминирующих кодонов на варьирующем генотипическом фоне.

S u m m a r y

In the course of the investigation of super-suppression in the Peterhoff genetic stocks of *Saccharomyces cerevisiae* the recessive nonsense suppressors have been obtained as well as dominant and semidominant ones. The complementation and linkage data showed the distribution of recessive suppressors among 2 unlinked genes, namely sup1 and sup2. Some

mutations in both genes result in temperature sensitivity of the mutants at 36°. We have demonstrated the inhibition of protein synthesis in the cells of one of these mutants at the restrictive temperature using ¹⁴C-aminoacids incorporation. The investigation of protein synthesis in mutant cells and cell-free experiments with endogenous messengers have shown this mutant to have a block in assembly of polysomes causing by some defect in initiation mechanism. Both genetical and biochemical data suggest that the products of sup1 and sup2 are ribosomal proteins from tRNA-accepting site of ribosome. Mutational change of them increases the possibility of translational errors because of mispairing of codons with anticodons. The mutations in sup1 and sup2 per se do not exhibit the suppressor activity, but are the necessary genetic background for the expression of suppressor activity by the other genes. This activity expresses in the course of interaction of sup1 and sup2 with genes named nonsense translation factors.

Our data show the existence of the ambiguity of translation of terminating codons.

У к а з а т е л ь л и т е р а т у р ы

- А н д р и а н о в а В.М., М и р о н о в а Л.Н., И н г е - В е ч т о м о в С.Г. Температурочувствительность дрожжей, обусловленная полудоминантной супрессорной мутацией. - "Вестн. Ленингр. ун-та", 1973, № 2, с.130-135.
- И н г е - В е ч т о м о в С.Г. Реверсии к прототрофности у дрожжей, нуждающихся в аденине. - "Вестн. Ленингр. ун-та", 1964, № 2, с.112-115.
- И н г е - В е ч т о м о в С.Г., А н д р и а н о в а В.М. Рecessивные суперсупрессоры у дрожжей. - "Генетика", 1970, т.6, № 11, с.103-115.
- И н г е - В е ч т о м о в С.Г., С и м а р о в Б.В. Связь супрессии и межallelльной комплементации в локусе ade₂ у *Saccharomyces cerevisiae*. - "Исслед. по генетике", 1967, № 3, с.127-148.
- М и р о н о в а Л.Н. Генетический контроль трансляции нонсенс-кодонов у дрожжей. Автореф. канд. дис. Л., 1973.
- С и м а р о в Б.В., М и р о н о в а Л.Н. Новый тип доминантных супрессоров у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. - "Генетика", 1972, № 8, с.102-112.
- Т е р - А в а н е с я н М.Д., И н г е - В е ч т о м о в С.Г. Локализация мутаций во II хромосоме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. - "Генетика", 1974, т.10, № 5, с.117-121.
- P i r i o n D., S c h l e s s i n g e r D. Functional interdependence of ribosomal components of *E. coli*. - "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1969, vol.63, N 3, p.794-799.
- B e a u d e t A.L., C a s k e y C.T. Polypeptide chain termination. - In: The mechanism of protein synthesis and its regulation. Amsterdam, 1972, p.133-172.
- C r i c k F.H.C., O r g e l L.H. The theory of inter-allelic complementation. - "J. Mol. Biol.", 1964, vol.8, p.161-165.
- G a n o z a M.C., T o m p k i n s J.K.N. Polypeptide chain termination in vitro: competition for nonsense codons between a purified release

- factors and suppressor tRNA. - "Bioch. Bioph. Res. Commun.", 1970, vol.40, p.1455-1467.
- G h o s h K., G h o s h H.P. Role of modified nucleotides in transfer ribonucleic acid. Effect of removal of the modified base adjacent to 3'end of the anticodon in codon-anticodon interaction. - "J. Biol. Chem", 1972, vol.247, p.3369-3377.
- G o r i n i L. The contrasting role of strA and ram gene products in ribosomal functioning. - "Cold Spring Harbor Symp. in Quant. Biol.", 1969, vol.34, p.101-111.
- G o r i n i L. Ribosomal discrimination of tRNA's. - "Nature New Biol.", 1971, vol.234, p.261-264.
- G r u n b e r g - M a n a g o M., D o n d o n J., G r a f f M. Inhibition by thiostepton of the IF2 dependent ribosomal GTPase. - "FEBS Letters", 1972, vol.22, p.217-221.
- H a w t h o r n e D.C. Identification of nonsense codons in yeast. - "J. Mol. Biol.", 1969, vol.43, p.71-75.
- H a w t h o r n e D.C., L e u p o l d U. Suppressors in yeast. - "Current topics in microbiol.", 1974, vol.64, p.1-45.
- K a y A.C., G r u n b e r g - M a n a g o M. Bacillus stearothermophilus inhibition factors and their properties in E.coli and B.stearothermophilus protein initiation systems. - "Biochemie", 1973, vol.54, N 10, p.1281-1290.
- M a n n e y T.R. Action of super-suppressors in yeast in relation to allelic mapping and complementation. - "Genetics", 1964, vol.50, p.109-115.
- M o r t i m e r R.K. Genetic redundancy in yeast. - "Genetics", 1969, vol.61, p.329-334.
- P h i l l i p s S.L., S c h l e s s i n g e r D., A p i r i o n D. A "ts" strain that suppress UGA and UAA codons at elevated temperatures. - "Genetics", 1969, vol.61, p.47-52.
- P h i l l i p s S.L., S c h l e s s i n g e r D., A p i r i o n D. Temperature dependent suppression of UGA and UAA codons in a temperature-sensitive mutants of E.coli. - "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1969, vol.34, p.499-503.
- R o s e n B., R o t h m a n F., W e i g e r t M.G. Miscoding caused by 5FU. - "J. Mol. Biol.", 1969, vol.44, p.363-368.
- S i m a r o v B.V., M i r o n o v a L.N., I n g e - V e c h t o - m o v S.G. Nonsense-missense suppression in yeast. - "Mol. Gen. Genet.", 1971, vol.113, p.302-307.
- S m i r n o v V.N., K r e i e r V.G., L i z l o v a L.V. e.a. Recessive super-suppression in yeast. - "Mol. Gen. Genet.", 1974, vol.129, p. 105-117.
- S m i t h J.D. Genetics of transfer RNA. - "Ann. Rev. of Genet.", 1972, vol.6, p.235-271.
- S o l l L., B e r g P. Recessive lethal nonsense suppressor in E.coli which inserts glutamine. - "Nature", 1969, vol.223, p.1340-1342.
- T a t e W.P., C a s k e y C.T. The mechanism of peptide chain termination. - "Mol. a. Cell. Biochem.", 1974, vol.5, N 3, p.115-134.
- Y a m a m o t o M., E n d o H., K u w a n o M. A temperature sensitive mutation in E.coli transfer RNA. - "J. Mol. Biol.", 1972, vol.63, p.387-396.